

APPLICANT: LUISI, Pier Luigi

Process for the production of solutions of inverted micellae

The invention relates to the use of inverted micellae and micro-emulsions of water in oil as delivery systems for medicaments and compounds for cosmetic usage, and in particular a new preparation method of a solution containing the materials having pharmaceutical or cosmetic activity. In particular, it concerns a hydrocarbon solution or organic solution containing inverted micellae, which are capable of dissolving hydrophilic substances, having pharmacological activity, inside the aqueous micro-phase.

The invention is primarily characterised in that the active substance is solubilized in the same way in an oily solution (e.g. isopropyl palmitate, miglyol or natural oily substances, or essential oils, or natural terpenes or hydrocarbons such as squalane, squalene and derivatives).

It is known that a few surfactants can form stable spherical aggregates in apolar solutions. The polar heads of the surfactant point inwards in these aggregates; thus, a polar nucleus is produced, which in turn can form a solution with water. Inside this aqueous micro-phase, the size of which lies between 10 and 200 Å, hydrophilic substances may be solubilized. In this way, thermodynamically stable, clear solutions are formed. The chemical and physical properties of such aggregates have been examined comprehensively by authors such as Fendler, Menger, Eicke in the last 10 years; see J.H. Fendler, "Membrane mimetic chemistry", John Wiley and Sons, N.Y. 1982; F.M. Menger et al., J. Amer. Chem. Soc. 95, 286 (1983); H.F. Eicke and J. Rehak, Helv. Chim. Acta 59, 2883 (1976); H.F. Eicke Topics Curr. Chem., 87, 85 (1980). For a detailed description, we recommend the book "Reverse Micelles" Plenum Press 1984, New York, edited by P.L. Luisi and B. Straub. On the other hand, there are few pharmaceutical applications, with the exception of the preparation of "nano-capsules", as proposed by Speiser in Zürich; see: P.P. Speiser, in "Applied Biology and Therapeutics" 6, Lingle and Breimer editors, Elsevier, N.Y. 1983.

The most important characteristic of this system is that the hydrophilic molecules, including enzymes, nucleic acid and polysaccharides, can be solubilized in hydrocarbon solutions. With the assistance of the inverted micellae, the enzymes which

are dissolved in hydrocarbon cannot lose their activity; see P.L. Luisi and R. Wolf, "Solution behaviour of surfactants" vol. 12, Mittel and Fendler eds., Plenum Press 1982.

The system with biological substances that has been examined mostly is that formed by isooctane/AOT/water. AOT is the abbreviation for the well-known bio-compatible surfactant, sodium-1,2-bis-(2-ethylhexyloxycarbonyl)-1-ethane-sulphonate.

The organic solvent which has been used until now for the solubilization of proteins or peptides in inverted, micellar solutions is with few exceptions a hydrocarbon of low molecular weight, and as such is not ideal for direct pharmaceutical application.

This process describes how solutions or gels of medicaments or compounds which may have cosmetic activity can be produced using bio-compatible solvents, such as squalane, miglyol, esters of palmitic acid (especially isopropyl palmitate), vegetable oils, vaseline oil. The surfactant AOT is employed for several of the examples in this invention. In any case, the process can also be extended to other surfactants, as shown in the examples and the claims of this invention.

We have surprisingly been able to establish that micellar solutions of such systems have not been described in literature up to now. These are thermodynamically stable and may contain valuable parts of compounds which have pharmacological and cosmetic activity. This invention relates in particular to the uses of this system. It facilitates:

- i) gastrointestinal absorption of medicaments
- ii) transdermal absorption
- iii) cosmetic application.

The concentration of medicaments or cosmetics in the micellar solutions may be determined spectrophotometrically (UV or ORD). Chromatographic (e.g. HPLC) or electrophoretic methods may also be used.

In the case of enzymes, the concentration may be calculated in a simple manner from their activity, and is determined in a similar way to aqueous solutions; see P.L. Luisi and R. Wolf, "Solution behaviour of surfactants" vol. 12, Mittel and Fendler eds., Plenum Press 1982.

solution by means of the "backward transfer" method; see P.L. Luisi et al. in "Topics in Pharmaceutical Science", Breimer and Speiser eds. Elsevier (1983).

The urogastrone (human Epidermal Growth Factor, hEGF) is a hormone with new epithelium-forming activity, which can inhibit the acidic gastric secretion; see R. Hori et al. Chem. Pharm. Bull. 25, 1974 (1977); R. Hori et al. Japan Kokai, 76, 95 (1975). Thanks to these properties, the hEGF is a good agent against ulcers¹. It was established that gastro-intestinal absorption increases with the addition of olive oil or a glycerol derivative. On the other hand, it is known that a few surfactants can accelerate the rate of absorption; see G. Levy et al., J. Pharm. Sci., 55, 394 (1966). The inverted micellae (often called water/oil micro-emulsions) represent the ideal carrier for these hormones.

In a simple manner, the urogastrone is incorporated in the aqueous micro-phase and may diffuse from the organic solvent.

The most significant advantage of this system is the fact that the expensive biological material, in our case urogastrone, is not lost, since the hormone is only found in water within the inverted micellae.

Production of the micellar solutions, which contain urogastrone or fragments thereof, or the hormone modified by covalent binding with methoxypolyethylene glycol (PEG), is effected by the classic process for the preparation of micellar solutions; see: P.L. Luisi and R. Wolf, "Solution behaviour of surfactants" vol. 12, Mittel and Fendler eds., Plenum Press 1982. The surfactant (e.g. AOT) is dissolved in the solvent such that a surfactant solution of between 50 mM and 300 mM is obtained. Dissolution takes place at room temperature and without sonification. The aqueous solution of the biopolymer may be added to this organic solution, e.g. 1 ml of a buffered solution of urogastrone (phosphate 50 mM pH 7.0) is added to 100 ml of the previous organic AOT solution. The proportion of water in the system may in any case vary between 0 and 30%, especially between 0.03% and 3% (v:v).

Upon shaking by hand under these conditions for a few minutes, without sonification, a clear, transparent solution is produced. The solvents may be - as already mentioned - low molecular weight hydrocarbons, fluorinated hydrocarbons, natural and vegetable oils, squalane, squalene, esters of palmitic acid and of other fatty acids.

¹ Translator's note: Geschüre assumed to be Geschwüre

miglyol. The concluding concentration of biopolymer (in our case urogastrone) may vary within a wide range in the final solution, depending on the initial aqueous solution and the usage. It normally varies between 0.1 and 10 mg/ml, especially 0.1 and 1.0 mg/ml (concentration refers to total volume). The pH value may also have a broad range, but usually solutions with a pH value of between 5 and 7 are used.

The solutions prepared in this way are stable for a long time, especially if they are stored in a refrigerator (0-2°). For extended storage, the solutions are cooled to below 0°C. Precipitation is observed only at higher water concentrations (between 5 and 10%), but the system is reversible.

It should be noted that with low water concentrations (below 3%), the water does not freeze at 0°C.

Nowadays, medroxyprogesterone acetate is used for the therapy of a few hormone-dependent cancers by means of intra-muscular injection. The frequent occurrence of ulcers, linked with this type of administration, gives problems. Oral administration would be more comfortable if the problems of low absorption could be solved. The use of inverted micellae, produced by using a solvent as a continuous phase, in which the medroxyprogesterone acetate is poorly soluble, accelerates the ~~absorption rate, possibly because of direct action of the micellae on the biological~~ membranes, in which permeability to the medicament is increased.

Production of the micellar solutions containing medroxyprogesterone acetate is effected by the classic process for the preparation of micellar solutions, with the one variation that owing to the poor solubility of the medicament in water, it is dissolved in a previously-prepared micellar solution; see also: P.L. Luisi and R. Wolf, "Solution behaviour of surfactants" vol. 12, Mittel and Fendler eds., Plenum Press 1982.

Nitrites and nitrates are advantageously employed in a transdermal manner in solution or even better as gels of inverted micellae, in order to reduce pain and the frequency of anginal attacks.

The commercial salves consisting of Vaseline and lanolin hydrate, used as carriers for the nitroglycerines, are not rated highly by patients, and in addition it appears that they cannot maintain a constant plasmatic level of the medicament; see: S. Sved et al., J. Pharm. Sci., 70, 1368 (1981).

The gel which is transported on an appropriate fixed carrier, the object of this invention, has an adhesive section which ensures contact with the skin. This is not only the most comfortable form of usage, but can also control distribution of the medicine in order to ensure constant absorption.

Endopeptidases are used in cosmetics for the step-wise elimination of superfluous hair. Here, there is the difficulty of bringing the enzymes to the "bulbus pili". Owing to the fat layer which stems from tallow secretion, the "bulbus-pili" cannot be moistened by the aqueous solution.

The inverted micellae as water/oil micro-emulsions enable contact to be made between the enzyme and the base of the hair.

Examples:

1. 0.44 g of AOT are dissolved in 10 ml of isopropyl palmitate, so that a 100 mM solution of the surfactant is produced.

Using a micro-syringe, 100 micro-litres of an aqueous urogastrone solution (1 mg/ml in 50 mM phosphate buffer at a pH value of 7) are added to this solution. This addition takes place slowly, and afterwards the solution is slowly stirred by hand.

At the end of the operation, a clear solution is obtained, the urogastrone content of which can be determined by spectrophotometry.

2. A six percent soy lecithin solution in purified soy oil is produced at room temperature. 100 micro-litres of an aqueous solution of urogastrone modified with methoxypolyethylene glycol (PEG, 1 mg/ml) are slowly introduced to 10 ml of this solution. The operation continues as described above. The final solution contains 3% water and 0.03 mg/ml hormone.
3. 6 g of soy lecithin are dissolved in 100 ml of purified soy oil. 7 ml of water are added to this solution, which is stirred by hand until a clear micro-emulsion is formed. Then, 20 g of medroxyprogesterone acetate are added and stirred until it has completely dissolved.
4. 8.8 g of AOT are dissolved in 100 ml of isopropyl palmitate, and 6 ml of butan-1-ol are added to this solution as co-surfactant. Stirring is effected by hand until a clear solution is obtained, and this is subsequently heated to 45°C.

3 g of gelatine are suspended in 8 ml of water, then heated to 45°C, and after solubilization, this solution is slowly added whilst stirring to the solution already prepared. After a micro-emulsion has been obtained, it is allowed to cool and a gel is obtained. To the surface of this gel, which does not come into contact with the skin, nitroglycerine is added, which is absorbed on lactose and colloidal silica, in such a way that a concentration of medicament of 1 mg/cm² is obtained.

5. AOT is dissolved in squalane so that a 200 mM solution of surfactant is obtained. To 100 ml of this solution are added 3 ml of an aqueous buffer solution at pH 8 (borate 40 mM), which contains papain in a concentration of 10 mg/ml.

The invention also relates to a process for producing a new type of solution for topical application, which is capable of stimulating new epithelium formation, i.e. a solution containing substances having pharmaceutical activity for topical application. . In particular, it concerns a hydrocarbon solution or organic solution containing inverted micellae, which are capable of dissolving hydrophilic substances, having pharmacological activity, inside the aqueous micro-phase.

The invention is primarily characterised in that the active substance is solubilized in the same way in an oily solution (e.g. isopropyl palmitate, miglyol or natural essential oils, or hydrocarbons such as squalane, squalene and derivatives).

It is known that a few surfactants can form stable spherical aggregates in apolar solutions. The polar heads of the surfactant point inwards in these aggregates; thus, a polar nucleus is produced, which in turn can form a solution with water. Inside this aqueous micro-phase, the size of which lies between 10 and 200 Å, hydrophilic substances may be solubilized. In this way, thermodynamically stable, clear solutions are formed. The chemical and physical properties of such aggregates have been examined comprehensively by authors such as Fendler, Menger and Eicke in the last 10 years; see J.H. Fendler, "Membrane mimetic chemistry", John Wiley and Sons, N.Y. 1982; F.M. Menger et al., J. Amer. Chem. Soc. 95, 286 (1973); H.F. Eicke and J. Rehak, Helv. Chim. Acta 59, 2883 (1976). On the other hand, there are few pharmaceutical applications, with the exception of the preparation of "nano-capsules", as proposed by Speiser in Zürich; see: P.P. Speiser, in "Applied Biology and Therapeutics" 6, Lingle and Breimer editors, Elsevier, N.Y. 1983.

The most important characteristic of this system is that the hydrophilic molecules, including enzymes, nucleic acid and polysaccharides, can be solubilized in hydrocarbon solutions. With the assistance of the inverted micellae, the enzymes which are dissolved in hydrocarbon cannot lose their activity; see P.L. Luisi and R. Wolf, Bioch. Bioph. Res. Comm. 89, 209 (1979).

The system with biological substances that has been examined mostly is that formed by isooctane/AOT/water. AOT is the abbreviation for the well-known bio-compatible surfactant, sodium-1,2-bis-(2-ethylhexyloxycarbonyl)-1-ethane-sulphonate.

The organic solvent which has been used until now for the solubilization of proteins or peptides in inverted, micellar solutions is with few exceptions a

hydrocarbon of low molecular weight, and as such is not ideal for direct pharmaceutical application.

This process describes how solutions of peptides and proteins (especially the epidermal growth factor : EGF) can be produced using bio-compatible solvents, such as squalane, miglyol, esters of palmitic acid (primarily isopropyl palmitate), vegetable oils, Vaseline oil. The surfactant AOT is employed for several of the examples in this invention. In any case, the process can also be extended to other surfactants, as shown in the examples and the claims of this invention.

We have surprisingly been able to establish that micellar solutions of such systems have not been described in literature up to now. These are thermodynamically stable and may contain valuable parts of peptides and proteins. This invention primarily relates to the topical application of EGF.

To supplement this, the process is described, in which the tryptic Kunitz inhibitor (aprotinin) or lipoxxygenase inhibitors or non-steroidal antiphlogistic or sodium aluronate is solubilized in such systems.

The combination of the two micellar systems (one contains EGF, the other the inhibitor or the non-steroidal antiphlogistic or sodium alurate) may be used as a stable mixture for therapeutical purposes.

It is already known that EGF may have an effect on the eyes; see P.N. Paul, Trends in Bioch. Sc., 201, May 1984. In addition, it is well known that the conventional eye solutions produce great losses in active principle. They are normally aqueous solutions and are easily diluted and removed by tears. An oily solvent would therefore be very suitable, insofar as it is more difficult to wash out, but it is impossible to solubilize EGF (or any other protein or peptide or hydrophilic compound) in oily solutions.

The inverted micellae (often called water-in-oil emulsions) are thus agents which overcomes this obstacle. The EGF is readily taken up into the aqueous phase and can diffuse from the organic phase. The decrease in surface tension brought about by the surfactant ensures good contact with the surface receiving attention and even distribution. With substances of relatively low viscosity, such as the above-mentioned organic solvents, drops of minute dimensions may be formed.

This is tremendously important for the production of eye drops, since the volume of the eye drops is normally 7 microlitres. Larger amounts of liquid are immediately ejected from the eyes. The great advantage of this system is that the expensive biological material, in our case EGF, is not lost as in the case of pure aqueous eye drops. A problem associated with the therapy of many injuries is that the proteinase-type activity causes a slow-down in recovery. It has been proved indirectly that proteinase inhibitors can alleviate these problems since they eliminate the proteinase activity. As mentioned above, the inhibitors may be readily taken up in the inverted micellae. The system containing the inhibitors is used in therapy as a co-adjuvant.

The mixed systems may be prepared in two ways: EGF and inhibitor (e.g. aprotinin; see the examples) are added together to an aqueous solution, and this mixture is added to the micellar hydrocarbon system, as described more fully below. Also, two different micellar solutions may be produced, which are mixed together later, or they can be added after one another externally, if possible in appropriate different dosages.

It is additionally known - see: R. Rochels and W.D. Busse, Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 220, 74 (1983) - that a few lipooxygenase inhibitors accelerate new epithelium formation in rabbits whose corneal epithelium has been scratched out. Sodium aluronate appears to have a similar effect. Also in this case, a mixed system can enhance the therapeutical activity of the EGF.

In the production of the micellar solutions which contain EGF or aprotinin or cyclo-oxygenase inhibitors or sodium aluronate, the classic process for the production of enzymatic micellar solutions is followed; see: R. Wolf and P.L. Luisi, Bioch. Bioph. Res. Comm. 89, 209 (1979). The surfactant (e.g. AOT) is dissolved in the solvent so that a surfactant solution of between 50 mM and 300 mM is produced. Dissolution occurs at room temperature and without sonification.

The aqueous EGF solution of the biopolymer may be added to this solution, e.g. 1 ml of a buffered solution of phosphate (50 mM pH 7.0) is added to 100 ml of the previous organic AOT solution. The proportion of water in the system may in any case vary between 0 and 30%, especially between 0.00% and 10% (v:v).

Upon shaking by hand under these conditions for a few minutes, without sonification, a clear, transparent solution is produced. The solvents may be - as already mentioned - low molecular weight hydrocarbons, fluorinated hydrocarbons, natural and vegetable oils, squalane, squalene, esters of palmitic acid and of other fatty acids, miglyol, natural essences. The concluding concentration of biopolymer (in our case EGF or a protein inhibitor) may vary within a wide range in the final solution, depending on the initial aqueous solution and the usage. It normally varies between 0.1 and 100 mg/ml, especially 0.1 and 10 mg/ml (concentration refers to total volume). The pH value may also have a broad range, but usually solutions with a pH value of between 4 and 9 are used.

The solutions prepared in this way are stable for a long time, especially if they are stored in a refrigerator (0-2°). For extended storage, the solutions are cooled to below 0°C. Precipitation is observed only at higher water concentrations (between 5 and 10%), but the system is reversible.

It should be remarked that with low water concentrations (below 3%), the water does not freeze at 0°C.

Example 1

0.44 g of AOT are dissolved in 10 ml of isopropyl palmitate, so that a 100 mM solution of the surfactant is produced.

Using a micro-syringe, 100 micro-litres of an aqueous EGF solution (1 mg/ml in 50 mM phosphate buffer at a pH value of 7) are added to this solution. This addition takes place slowly, and afterwards the solution is slowly stirred by hand.

At the end of the operation, a clear solution is obtained, the EGF content of which can be determined by spectrophotometry.

Example 2

A sodium laurate (200 mM) solution in squalane with 10% hexan-1-ol is prepared at room temperature. 300 microlitres of an aqueous EGF solution (1 mg/1 ml) are slowly injected into 10 ml of this solution. The process is effected as described above. The final solution contains 3% water in 0.03 mg/ml EGF.

Example 3

100 mg of BRIT 56, which contains 6% hexan-1-ol and 1% water, forms a micro-emulsion in miglyol Shell. Using a micro-syringe, 200 micro-litres of an EGF solution (1.5 mg/ml) and 200 micro-litres of an aqueous solution of aprotinin (Kunitz inhibitor) are slowly added to 10 ml of this solution. The mixture is slowly stirred by hand.

Alternatively, instead of aprotinin, a lipoxxygenase or sodium laurate inhibitor may be used, so that the same molar ratio of EGF:coadjuvant is maintained.

Example 4

Tetraethylene glycol dodecylether is dissolved in squalane, so that a 200 mM solution of the surfactant is produced. To 100 ml of this solution are added 3 ml of an aqueous buffered solution (borate 40 mM, pH 8.0), which contains the kunitz inhibitor (aprotinin) in a concentration of 10 mg/ml.

Finally, the invention also relates to a process for the production of gels consisting of surfactant-containing, organic solvents, and their use in biotechnology, pharmacology, photography and cosmetics.

1. To this end, a process for gelling apolar solutions is described. This takes place by means of solutions of surfactants in hydrocarbons, which also contain water and gelatin. Under conditions in which gelatin gels in aqueous solutions, gelling also takes place in the organic solvents of the surfactant, whereby the whole organic medium is transformed into a gel.

2. It is known that gelatin can gel in water and form solid gels, which may have great technological significance today, especially in the foodstuffs industry. However, these gels are also of interest in other fields of technology, e.g. in photography or in all fields where hydrophilic films or layers are important. As is known, gelling is effected in aqueous solutions in such a way that a solution of gelatin (e.g. 10 mg/ml) is produced at 40° or higher and is then cooled. Gelling takes place at below 37°. This phenomenon was examined in depth. Compounds such as polysaccharides can also form gels.

3. On the other hand, it is also known that proteins can be solubilized in apolar solvents, by means of inverted micellae or water-in-oil micro-emulsions. Inverted micellae are spheroidal aggregates which are formed by certain surfactants in hydrocarbons and other organic apolar solvents, such that the polar heads of the surfactant molecules point inwards. Thus, a polar nucleus is formed in the centre of the spheroidal aggregate (the inverted micellae), whereby the apolar chains of the surfactant molecules are in contact externally with the apolar solvent. The polar nucleus can form a solution with water. With a higher water content, the term "micro-emulsion" is usually used instead of "reversed (or inverted) micellae". In the aqueous nucleus (the so-called "water pool"), hydrophilic molecules, including proteins, can be solubilized. In recent years, various proteins have been solubilized using these methods, e.g. in iso-octane with (2-ethylhexyl) sodium sulphasuccinate (AOT) as surfactant, whereby the water content in the system was only 1-5%. We thus have a system in which hydrophilic biopolymers may be solubilized in an apolar solvent. Such a solution is thermodynamically stable and may be analysed spectroscopically. Thus, normal enzymatic reactions can be carried out.

4. The main idea is to combine the two processes, namely solubilization of proteins in apolar solvents and gelling, e.g. of gelatin. The preparation of such an apolar gel can be described as follows: Gelatin is added to water (or buffered aqueous solutions) and whilst stirring a solution of gelatin in water is obtained. An organic solvent (e.g. iso-octane), which contains the surfactant, is added to the gelatin solution. The concentration of the surfactant varies between 0 and 1 M, especially between 5 and 300 mM. The volume of water lies between 0.5 and 30%. The proportion of gelatin by weight in the aqueous solution is 1 - 70%, especially 5 - 50%. The whole operation of preparing and mixing the two solutions is effected at above the melting point of the gel, especially between 20 and 60°C. When the resultant mixture cools, a gel is obtained. Under normal conditions, the transition is observed at the same temperature at which gel formation also takes place in aqueous solution. The process of gel formation from apolar solvents with inverted micellae or micro-emulsions is reversible, i.e. the gel can be melted again upon heating. Under certain conditions, water content and gelatin concentration, the gels are transparent. Gelling of the organic phase does not take place at any combination of water content and gelatin concentration. In general, if the water content is reduced, the gelatin concentration must be increased accordingly (see figure 1).

5. Formation of the gel also takes place in the presence of other molecules in addition to the gelatin. In this way, different compounds may be homogeneously dispersed in the gelled mass. Interestingly, this is the case both for hydrophilic molecules, which are solubilized in the water pool of the inverted micelle, and for wholly hydrophobic molecules, which are solubilized in the organic solvent outside of the aqueous micro-phases. This may also take place with amphiphilic molecules, i.e. molecules which are incorporated in the wall of the micelle. It may thus be seen that with our method, three important classes of compounds, namely water-soluble compounds, compounds which are soluble in apolar solvents, and those which remain in intermediate phases, may be homogeneously embedded in a gel. In this way e.g. hydrophilic enzymes or even cells may be embedded in the gel mass. This may be of great bio-technological interest, since this system offers a method whereby enzymes and cells can be introduced to a hydrophobic medium. Furthermore, pigments and dyes (especially important for the photographic industry) or even medicaments, may also be

embedded in the gel mass. The latter ought to be of interest for cutaneous treatment. Finally, the gelled mass may also be used in cosmetics if an appropriate active ingredient is included.

6. This process of gelling apolar solvents is not restricted to the iso-octane/AOT system. Other aliphatic and aromatic hydrocarbons, both of synthetic and natural origin, may serve as solvents. Solvent mixtures may also be used. Other surfactants of anionic, cationic and also non-ionic nature (such as those having an ethylene oxide structure) may similarly be used. Instead of gelatin, other compounds which form gels in aqueous solutions may be employed, e.g. polysaccharides, such as agarose, agar-agar etc.

EXAMPLES

Example 1

Production of gels from hydrocarbons

220 mg of gelatin (250 Bloom, Fluka) are dissolved whilst stirring in 0.72 ml of water. To this gelatin solution are added 2.5 ml of 200 mM AOT/iso-octane solution, and the mixture is subsequently diluted with iso-octane to a total of 5 ml. All these operations are carried out at above 40°C. The solution is then cooled to room temperature whilst stirring. A solid gel is obtained.

Example 2

Incorporation of a water-soluble dyestuff

As in example 1, except that instead of water, an aqueous 1 mM alizarin red S solution is used. A red gel is obtained.

Example 3

Incorporation of a isooctane-soluble dyestuff

As in example 1, except that the 2.5 ml of AOT/iso-octane solution additionally contains 1 mg of Sudan red 7B. A deep-red gel is obtained.

Example 4

Incorporation of an active ingredient

As in example 1, except that instead of water, an aqueous 0.5 mM vitamin B12 solution is used. A rose-red gel is obtained.

Example 5

Incorporation of an aromatic substance

As in example 1, except that instead of water, an aqueous 3 mM solution of vanillin is used. A colourless, transparent gel is obtained.

Example 5Incorporation of an enzyme

As in example 1, except that instead of water, an aqueous 10^{-5} M lipxygenase solution is used.

Patent Claims

1. Process for the production of solutions of inverted micellae (also called micro-emulsions if the water content in the system is relatively high), by means of AOT surfactant, sodium-1,2-bis-(2-ethylhexyloxycarbonyl)-1-ethane-sulphonate, and natural organic solvents, such as squalane, essential oils, terpenes, vegetable oils, miglyol, esters of natural fatty acids (palmitic acid, stearic acid, etc.), perfluorinated hydrocarbons.
2. Process according to claim 1, characterised in that other surfactants are used instead of AOT, especially benzalkonium chloride; CTAB (cetyl-trimethyl-ammonium bromide); surfactants based on other quaternary ammonium salts; surfactants based on ethylene glycol; surfactants of natural origin such as phospholipids, lecithins, phospholecithins, phosphodilcolines; synthetic surfactants which have a core of glycerol; surfactants which have the structure of fatty acid esters, e.g. sorbitan tristearate or polyoxyethylene sorbitan oleate (Polisorbato 80).
3. Process according to one of claims 1 to 2, characterised in that co-surface-active agents or co-adjuvants are added to the system (as well as any mixture of two or more of the above-mentioned surfactants).
4. Process according to one of claims 1 to 3, characterised in that the system contains substances which have therapeutic or cosmetic activity.
5. Process according to one of claims 1 to 3, characterised in that the system contains medicaments, and is used to promote absorption in the intestines and also through the skin.
6. Process according to one of claims 1 to 3, characterised in that the system contains substances which have cosmetic activity and promote penetration into the skin (e.g. enzymes as co-adjuvants for hair removal).
7. Process according to claim 1 for the production of solutions of inverted micellae (also called micro-emulsions if the water content in the system is relatively high), by means of AOT surfactant, sodium-1,2-bis-(2-ethylhexyloxycarbonyl)-1-ethane-sulphonate, and natural organic solvents, such as squalane, essential oils, vegetable oils, miglyol, esters of natural fatty acids (palmitic acid, stearic acid, etc.).

8. Process according to claim 7, characterised in that the system contains compound which can stimulate new epithelium formation.
9. Process according to claim 7, characterised in that the system contains the epidermal growth factor (EGF) or other natural or synthetic growth factors for therapeutical or clinical applications.
10. Process according to claim 7, characterised in that the system contains protease inhibitors or lipoxygenase or non-steroidal antiphlogistic agents or sodium aluronate.
11. Process in which the combination of claims 9 and 10 is used for clinical application and in particular for new corneal epithelium formation (hormone scraping, ulcers, "keratitis") and for the treatment of burns.
12. Process according to claim 7, characterised in that surfactants other than AOT are used, especially benzalkonium chloride; CTAB (cetyl-trimethyl-ammonium bromide); surfactants based on other quaternary ammonium salts; surfactants based on ethylene glycol; surfactants of natural origin such as phospholipids, lecithins, phospholecithins, phosphodilcolines; synthetic surfactants which have a core of glycerol; surfactants which have the structure of fatty acid esters, e.g. sorbitan tristearate or polyoxyethylene sorbitan oleate (Polysorbate 80).
13. Process according to claims 7 and 12, characterised in that co-surface-active agents or co-adjuvants are added to the system (as well as any mixture of two or more of the above-mentioned surfactants).
14. Process for the production of gels, characterised in that a mixture of iso-octane, AOT, water and gelatin is prepared and left to gel.
15. Process according to claim 14, characterised in that other apolar solvents are used, such as perfluorine compounds, and natural oils and liquids.
16. Process according to one of claims 14 to 15, characterised in that instead of AOT, other surfactants or surfactant systems are also used.
17. Process according to one of claims 14 to 16, characterised in that agarose or other polysaccharides are used instead of gelatin.
18. Process according to one of claims 14 to 17, characterised in that one or more additional compounds are present in the mixture, and are fixed in the gel during gelling, whereby such additional compounds may be both high molecular weight

products, such as proteins, enzymes, nucleic acids, cells, viruses and micro-organisms, and low molecular weight compounds, such as pigments, dyes, pharmaceuticals and also salts.

19. Process according to claim 18, characterised in that these gels are used in pharmacology, for dermal applications and treatments.

20. Process according to claim 18, characterised in that these gels are used as carriers for pigments or dyes, e.g. in photography.

21. Process according to claim 18, characterised in that these gels are used for chromatography and/or electrophoresis.

22. Process according to claim 18, characterised in that these gels are used as carriers for enzymes, micro-organisms and cells.

Fig. 1

gelatin in H₂O

no gel formation

gel formation

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)(51) Internationale Patentklassifikation⁴ :

A61K 7/00, 9/10

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 86/ 0226

A1

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

24. April 1986 (24.04.86)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH85/00154

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. Oktober 1985 (18.10.85)

(31) Prioritätsaktenzeichen: 4983/84-9

(32) Prioritätsdatum: 18. Oktober 1984 (18.10.84)

(33) Prioritätsland: CH

(71)(72) Anmelder und Erfinder: LUISI, Pier Luigi [IT/CH];
Moussonstrasse 22, CH-8044 Zürich (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MENEGATTI, Enea
[IT/IT]: Via Scandiana 21, I-44100 Ferrara (IT).
MENDLER, Markus [CH/CH]; PANDE, Ajay [IN/
CH]; JACKLE, Hans [CH/CH]; Institut für Polymere,
ETH Zentrum, CH-8092 Zürich (CH).(74) Anwalt: E. BLUM & CO.; Vorderberg 11, CH-3044 Z.
rich (CH).(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AL,
BE (europäisches Patent), BG, BR, CH (europäische
Patent), DE (europäisches Patent), DK, FR (europäi-
sches Patent), GB (europäisches Patent), HU, IT (eu-
ropäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL
(europäisches Patent), NO, RO, SE (europäisches Pa-
tent), SU, US.

Veröffentlicht

*Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugela-
senen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Än-
derungen eintreffen.*

(54) Title: PROCESS FOR PREPARING A SOLUTION OF INVERTED MICELLAE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON LÖSUNGEN VON UMGEKEHRTEN MIZELLEN

(57) Abstract

Preparation of systems of inverted micellae (also called oil and water micro-emulsion), by using oil and other biocompatible liquids as solvents and a process to thicken these fluid systems or to transform them into a gel; and the use of such fluid or gellified systems. The use of said systems enables to achieve an easier absorption of drugs or cosmetics through the intestine or the skin.

(57) Zusammenfassung

Die Verwendung von Systemen aus umgekehrten Mizellen (auch Mikroemulsionen Wasser/Oel genannt), unter Verwendung von Ölen und anderen flüssigen biokompatiblen Verbindungen als Lösungsmittel, und ein Verfahren, um solche flüssige Systeme zu verdicken oder in ein Gel umzuwandeln; und die Anwendung solcher flüssigen oder gelierten Systeme, um die Darm- und transdermische Absorption von Arzneimitteln oder kosmetische Anwendungen zu vereinfachen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	ML	Mali
AU	Australien	GA	Gabun	MR	Maunianien
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Konigreich	MW	Malawi
BE	Belgien	HU	Ungarn	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	IT	Italien	NO	Norwegen
BR	Brasilien	JP	Japan	RO	Rumanien
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SL	Soviet Union
DE	Deutschland, Bundesrepublik	LU	Luxemburg	TD	Tschad
DK	Danemark	MC	Monaco	TG	Togo
FI	Finnland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika

- 1 -

Verfahren zur Herstellung von Lösungen von umgekehrten Mizellen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von umgekehrten Mizellen und Mikroemulsionen aus Wasser in Öl als Abgabesystem von Arzneimitteln und Verbindungen für den kosmetischen Gebrauch und insbesondere eine neue Vorbereitungsmethode einer Lösung, die Stoffe mit pharmazeutischer oder kosmetischer Wirkung enthält. Insbesondere handelt es sich um eine Kohlenwasserstoff- oder organische Lösung, die umgekehrte Mizellen enthält, die befähigt sind, im Innern der wässrigen Mikrophase hydrophile Substanzen, die pharmakologisch aktiv sind, zu lösen.

Die Erfindung ist hauptsächlich dadurch charakterisiert, dass der aktive Stoff gleichartig in einer öligen Lösung solubilisiert wird (z.B. Isopropylpalmitat, Mygliol oder natürliche ölige Substanzen, oder essentielle Öle, oder natürliche Terpene oder Kohlenwasserstoffe wie Squalan, Squalen und Derivate).

Es ist bekannt, dass einige Tenside stabile spherische Aggregate in apolaren Lösungen bilden können. Die polaren Köpfe des Tensids weisen in diesen Aggregaten nach innen; es entsteht somit ein polarer Kern, der seinerseits Wasser solubilisieren kann. Im Innern dieser

- 2 -

wässrigen Mikrophase, deren Grösse zwischen 10-200 Å liegt, können hydrophile Stoffe solubilisiert werden. Es bilden sich auf diese Weise thermodynamisch stabile und klare Lösungen. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften solcher Aggregate wurden von Autoren wie Fendler, Menger, Eicke in den letzten 10 Jahren ausführlich untersucht; siehe J.H. Fendler, "Membrane mimetic chemistry", John Wiley and Sons, N.Y. 1982; F.M. Menger et al., J. Amer. Chem. Soc. 95, 286 (1983); H.F. Heicke und J. Rehak, Helv. Chim. Acta 59, 2383 (1976); H.F. Heicke Topics Curr. Chem., 87, 85 (1980). Für eine detaillierte Beschreibung empfehlen wir das Buch "Reverse Micelles" Plenum Press 1984, New York, herausgegeben von P.L. Luisi und B. Straub. Es gibt dagegen wenige pharmazeutische Anwendungen mit Ausnahme von der Anwendung für die Vorbereitung von "Nanokapseln", wie von Speiser in Zürich vorgeschlagen; siehe: P.P. Speiser, in "Applied Biology and Therapeutics" 6, Lingle und Breimer editors, Elsevier, N.Y. 1983.

Das wichtigste Kennzeichen dieses Systems besteht darin, dass die hydrophilen Moleküle, inbegriffen Enzyme, Nukleinsäure und Polysaccharide, in Kohlenwasserstofflösungen solubilisiert werden können. Die in Kohlenwasserstoff gelösten Enzyme können mit Hilfe der umgekehrten Mizellen ihre Aktivität nicht verlieren; siehe P.L. Luisi und R. Wolf, "Solution behaviour of surfactants" vol. 12, Mittel and Fendler eds., Plenum Press 1982.

Das am meisten untersuchte System mit biologischen Substanzen ist aus Isooctan/AOT/Wasser gebildet. AOT ist die Abkürzung für das wohlbekannte biokompatible Tensid, Natrium-1,2-bis (2-Ethylhexyloxycarbonyl)-1-ethansulfonat.

Das organische Lösungsmittel, das bis jetzt zur

- 3 -

Solubilisierung von Proteinen oder Peptiden in mizellaren umgekehrten Lösungen verwendet wurde, ist mit wenigen Ausnahmen ein Kohlenwasserstoff von niedrigem Molekulargewicht und, als solcher, nicht ideal für eine direkte pharmazeutische Anwendung.

In diesem Verfahren wird beschrieben, wie Lösungen oder Gele von Arzneimitteln oder Verbindungen, die eine kosmetische Aktivität aufweisen können, mittels biokompatiblen Lösungsmitteln wie Squalan, Miglyol, Estern von Palmitinsäure (insbesondere Isopropylpalmitat), Pflanzenöle, Vaselineöl, hergestellt werden. Das Tensid AOT wird für mehrere in dieser Erfindung angegebene Beispiele verwendet. Das Verfahren kann auf jeden Fall auch auf andere Tenside erweitert werden, wie in den Beispielen und in den Ansprüchen dieser Erfindung gezeigt wird.

Wir haben feststellen können, dass erstaunlicherweise mizellare Lösungen solcher Systeme bis jetzt in der Literatur nicht beschrieben wurden. Diese sind thermodynamisch stabil und können wertvolle Anteile von Verbindungen, die eine pharmakologische und kosmetische Wirkung haben, enthalten. Diese Erfindung beschäftigt sich insbesondere mit Verwendungen dieses Systems. Sie erleichtern:

- i) Die gastrointestinale Absorption von Arzneimitteln
- ii) Die transdermische Absorption
- iii) Die kosmetische Anwendung.

Die Arzneimittel- oder Kosmetikakonzentrationen in den mizellaren Lösungen können spektrophotometrisch bestimmt werden (UV oder ORD). Es können auch chromatographische (z.B. HPLC) oder elektrophoretische Methoden angewendet werden.

Im Falle der Enzyme kann die Konzentration auf eine einfache Weise aus ihrer Aktivität berechnet werden,

- 4 -

die auf ähnliche Weise für wässrige Lösungen bestimmt wird; siehe P.L. Luisi und R. Wolf, "Solution behaviour of surfactants" vol. 12, Mittel and Fendler eds., Plenum Press 1982.

5 Sollte es notwendig sein, die pharmakologische Aktivität abzuschätzen (z.B. im Falle von Hormonen), kann das Arzneimittel einfach von der mizellaren in eine wässrige Lösung mittels "Backward Transfer" Methode versetzt werden; siehe P.L. Luisi et al. in "Topics in Pharmaceutical Science", Breimer and Speiser eds. Elsevier (1983).

10 Das Urogastron (human Epidermal Growth Factor, hEGF) ist ein Hormon mit neuer Epitel-bildender Aktivität, das die saure Magenabsonderung hemmen kann; siehe R. Hori et al. Chem. Pharm. Bull. 25, 1974 (1977);
15 R. Hori et al. Japan Kokai, 76, 95 (1975). Dank dieser Eigenschaften stellt das hEGF ein gutes Mittel gegen Geschüre dar. Man hat festgestellt, dass mit der Zugabe von Olivenöl oder einem Glycerol-Derivat die gastrointestinale Absorption zunimmt. Andererseits ist es be-
20 kannt, dass einige Tenside die Geschwindigkeit der Absorption beschleunigen können; siehe G. Levy et al. J. Pharm. Sci., 55, 394 (1966). Die umgekehrten Mizellen (oft auch Mikroemulsionen Wasser/Öl benannt) stellen den idealen Träger für diese Hormone dar.

25 Das Urogastron ist in einfacher Weise in der wässrigen Mikrophase eingegliedert und kann aus dem organischen Lösungsmittel diffundieren.

 Der bedeutendste Vorteil dieses Systems besteht in der Tatsache, dass der teure biologische Stoff, in
30 unserem Fall Urogastron, nicht verloren geht, weil das Hormon nur im Wasser im Innern der invertierten Mizellen Platz findet.

 Die Herstellung der mizellaren Lösungen, die

- 5 -

Urogastron oder seine Bruchteile, oder das durch kovalente Bindung mit Methoxypolyethylenglykol (PEG) modifizierte Hormon enthalten, verfolgt das klassische Verfahren zur Vorbereitung mizellärer Lösungen; siehe: P.L. Luisi und R. Wolf, "Solution behaviour of surfactants" vol. 12, Mittel and Fendler eds., Plenum Press 1982. Das Tensid (z.B. AOT) wird im Lösungsmittel gelöst, so dass eine Tensidlösung zwischen 50 mM und 300 mM entsteht. Die Auflösung geschieht bei Raumtemperatur und ohne Sonifizierung. Zu dieser organischen Lösung kann man die wässrige Lösung des Biopolymers zugeben; z.B. 1 ml einer gepufferten Lösung von Urogastron (Phosphat 50 mM pH 7.0) werden zu 100 ml der vorherigen organischen AOT-Lösung zugefügt. Der Anteil von Wasser im System kann auf jeden Fall zwischen 0 bis 30%, insbesondere zwischen 0,03% bis 3% (v:v) variieren.

Unter diesen Bedingungen entsteht beim Schütteln von Hand während einigen Minuten und ohne Sonifizierung eine klare und durchsichtige Lösung. Als Lösungsmittel kommen - wie schon erwähnt - niedermolekulare Kohlenwasserstoffe, fluorierte Kohlenwasserstoffe, natürliche und pflanzliche Öle, Squalan, Squalen, Ester von Palmitinsäure und von anderen Fettsäuren, Miglyol in Frage. Die schlussendliche Konzentration des Biopolymers (in unserem Fall Urogastron) kann innerhalb der endgültigen Lösung in einem breiten Bereich variieren, gemäss der wässrigen Startlösung und dem Gebrauch. Normalerweise variiert sie zwischen 0,1 - 10 mg/ml, insbesondere 0,1 - 1,0 mg/ml (Konzentration bezüglich totalem Volumen). Der pH-Wert kann auch breit variiert werden, aber normalerweise werden Lösungen mit einem pH-Wert zwischen 5 und 7 verwendet.

Die auf diese Weise vorbereiteten Lösungen sind

- 6 -

für lange Zeit stabil, im besonderen, wenn sie im Kühlschrank ($0-2^{\circ}\text{C}$) aufbewahrt werden. Für eine verlängerte Aufbewahrung werden die Lösungen unter 0°C abgekühlt. Ein Niederschlag wird nur bei höherer Wasserkonzentration (zwischen 5% - 10%) beobachtet, aber das System ist reversibel.

Es ist zu bemerken, dass bei niedriger Wasserkonzentration (unter 3%) das Wasser nicht bei 0°C gefriert.

10 Medroxyprogesteronacetat wird heutzutage in der Therapie einiger hormonabhängiger Krebse durch intramuskuläre Spritzen verwendet. Das häufige Auftreten von Geschwüren stellt, verbunden mit dieser Art von Verabreichung, Probleme dar. Eine orale Verabreichung wäre
15 bequemer, wenn die Probleme mit einer kleinen Absorption gelöst werden könnten. Die Verwendung von umgekehrten Mizellen, hergestellt mittels Verwendung eines Lösungsmittels als kontinuierliche Phase, in der das Medroxyprogesteronacetat schwer löslich ist, beschleunigt die
20 ~~Absorptions-Geschwindigkeit, möglicherweise wegen direkter~~ Einwirkung der Mizellen auf die biologische Membrane, in der die Permeabilität zum Arzneimittel erhöht wird.

Die Vorbereitung der mizellaren Lösungen, enthaltend Medroxyprogesteronacetat, verfolgt das klassische
25 Verfahren der Zubereitung von mizellaren Lösungen mit der einzigen Variante, dass das Arzneimittel wegen seiner Schwerlöslichkeit in Wasser in einer im voraus vorbereiteten mizellaren Lösung gelöst wird; siehe auch: P.L. Luisi und R. Wolf, "Solution behaviour of surfactants"
30 vol. 12, Mittel and Fendler eds., Plenum Press 1982.

Nitrite und Nitrate werden auf transdermischem Weg in Lösungen oder noch besser als Gele von umgekehrten Mizellen vorteilhaft verwendet, um den Schmerz und die

- 7 -

Häufigkeit der anginösen Krisen zu vermindern.

Die aus Vaseline und Lanolinhydrat bestehenden kommerziellen Salben, verwendet als Träger der Nitroglycerine, werden von den Patienten nicht geschätzt, und es scheint ausserdem, dass sie ein konstantes plasmatisches Niveau der Arznei nicht halten können; siehe: S. Sved et al. J. Pharm. Sci., 70, 1368 (1981).

Das auf einem geeigneten festen Träger transportierte Gel, Gegenstand dieser Erfindung, ist mit einem Klebeanteil, der den Kontakt mit der Haut sicherstellt, versehen. Dies ist nicht nur die bequemste Gebrauchsform, sondern kann auch die Verteilung der Arznei steuern, um eine konstante Absorption sicherzustellen.

Endopeptidasen werden in der Kosmetik für die stufenweise Eliminierung überflüssiger Haare verwendet. Dabei stellt sich die Schwierigkeit, die Enzyme zum "bulbus pili" kommen zu lassen. Wegen der Fettstoffschicht, die aus der Talgsekretion stammt, kann das "bulbus pili" von der wässrigen Lösung nicht nass gemacht werden.

Die als Mikroemulsionen Wasser/Oel umgekehrten Mizellen ermöglichen den Kontakt zwischen dem Enzym und der Basis des Haares.

Beispiele:

1. 0,44 g AOT werden in 10 ml Isopropylpalmitat gelöst, so dass eine 100 mM Lösung des Tensides entsteht.

Zu dieser Lösung werden mittels einer Mikrospritze 100 Mikroliter einer wässrigen Urogastron-Lösung zugegeben (1 mg/ml in 50 mM Phosphat-Puffer bei einem pH-Wert von 7). Die Zugabe wird langsam durchgeführt, und nach Beendigung der Zugabe wird langsam von Hand gerührt.

Am Schluss der Operation erhält man eine klare

- 8 -

Lösung, deren Gehalt an Urogastron spektrophotometrisch bestimmt werden kann.

2. Eine 6-prozentige Sojalezithin-Lösung wird in gereinigtem Sojaöl bei Raumtemperatur hergestellt. In 10 ml dieser Lösung werden langsam 300 Mikroliter einer wässrigen Lösung von mit Methoxylpolyethylenglykol (PEG, 1 mg/ml) modifiziertem Urogastron eingeführt. Man arbeitet wie oben beschrieben. Die endgültige Lösung enthält 3% Wasser und 0,03 mg/ml Hormon.
3. 6 g Sojalezithin werden in 100 ml gereinigtem Sojaöl gelöst. Zu dieser Lösung werden 7 ml Wasser zugegeben, und es wird von Hand gerührt, bis sich eine klare Mikroemulsion bildet. Es werden dann 20 g Medroxyprogesteronacetat hinzugefügt und es wird bis zu dessen vollständiger Lösung gerührt.
4. 8,8 g AOT werden in 100 ml Isopropylpalmitat gelöst, und zu dieser Lösung werden 6 ml Butan-1-ol als Cotensid zugegeben. Es wird von Hand gerührt, bis eine klare Lösung entsteht, und anschliessend wird bis 45° C erwärmt. 3 g Gelatine werden in 8 ml Wasser suspendiert. Man erwärmt bis 45° C und nach der Solubilization wird diese Lösung langsam unter Rühren zu der schon vorbereiteten Lösung hinzugefügt. Nachdem man eine Mikroemulsion erhalten hat, lässt man diese abkühlen und erhält ein Gel. Auf der Oberfläche dieses Gels, welche nicht mit der Haut in Kontakt kommt, wird Nitroglyzerin zugesetzt, welches an Lactose und kolloidalem Silica absorbiert ist, und zwar derart, dass man eine Konzentration an Arzneimittel von 1 mg/cm² hat.
5. AOT wird in Squalan gelöst, so dass man eine 200 mM Lösung an Tensid erhält. Zu 100 ml dieser Lösung gibt

- 9 -

man 3 ml einer wässrigen Puffer-Lösung bei pH 8
(Borat 40 mM), die Papain in einer Konzentration von
10 mg/ml enthält, zu.

- 10 -

Die Erfindung betrifft auch ein Herstellungsverfahren einer neuen Art Lösung für die topische Anwendung, die im Stande ist, die neue Epitelbildung anzuregen, d.h. eine Lösung, die Stoffe mit pharmazeutischer Wirkung für topische Anwendung enthält. Insbesondere handelt es sich um eine Kohlenwasserstoff- oder organische Lösung, die umgekehrte Mizellen enthält, die befähigt sind, im Innern der wässrigen Mikrophase hydrophile Substanzen, die pharmakologisch aktiv sind, zu lösen.

10 Dieses erfindungsgemäße Verfahren ist hauptsächlich dadurch charakterisiert, dass der aktive Stoff gleichartig in einer öligen Lösung solubilisiert wird (z.B. Isopropylpalmitat, Miglyol, oder natürliche essentielle Öle oder Kohlenwasserstoffe wie Squalen, Squalan
15 und Derivate).

Es ist bekannt, dass einige Tenside stabile sphärische Aggregate in apolaren Lösungen bilden können. Die polaren Köpfe des Tensids weisen in diesen Aggregaten nach innen; es entsteht somit ein polarer Kern, der seinerseits Wasser solubilisieren kann. Im Innern dieser
20

- 11 -

- wässrigen Mikrophase, deren Grösse zwischen 10-200 Å liegt, können hydrophile Stoffe solubilisiert werden. Es bilden sich auf diese Weise thermodynamisch stabile und klare Lösungen. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften solcher Aggregate wurden von Autoren wie Fendler, Menger, Eicke in den letzten 10 Jahren ausführlich untersucht; siehe: J.H. Fendler, "Membrane mimetic chemistry", John Wiley and Sons, N.Y. 1982; F.M. Menger et al., J. Amer. Chem. Soc. 95, 286 (1973); H.F. Eicke und J. Rehak, Helv. Chim. Acta 59, 2883 (1976). Es gibt dagegen wenige pharmazeutische Anwendungen mit Ausnahme von der Anwendung für die Vorbereitung von "Nanokapseln", wie von Speiser in Zürich vorgeschlagen; siehe: P.P. Speiser, in Applied Biology and Therapeutics, 6, Lingle and Breimer editors, Elsevier, N.Y. 1983.

Das wichtigste Kennzeichen dieses Systems besteht darin, dass die hydrophilen Moleküle, inbegriffen Enzyme, Nukleinsäure und Polysaccharide, in Kohlenwasserstofflösungen solubilisiert werden können. Die in Kohlenwasserstoff gelösten Enzyme können mit Hilfe der umgekehrten Mizellen ihre Aktivität nicht verlieren; siehe: R. Wolf und P.L. Luisi, Bioch. Bioph. Res. Comm. 89, 209 (1979).

Das am meisten untersuchte System mit biologischen Substanzen ist aus Isooctan/AOT/Wasser gebildet. AOT ist die Abkürzung für das wohlbekannte biokompatible Tensid, Natrium-1,2-bis (2-Ethylhexyloxycarbonyl)-1-ethansulfonat.

Das organische Lösungsmittel, das bis jetzt zur Solubilisierung von Proteinen oder Peptiden in mizellaren umgekehrten Lösungen verwendet wurde, ist mit wenigen Ausnahmen ein Kohlenwasserstoff von niedrigem Molekulargewicht und, als solcher, nicht ideal für eine direkte

- 12 -

pharmazeutische Anwendung.

In diesem Verfahren beschreibt man, wie Lösungen von Peptiden und Proteinen (insbesondere der epidermische Wachstumsfaktor: EGF epidermal growth factor) hergestellt werden können, und zwar unter Verwendung von biokompatibeln Lösungsmitteln wie Squalan, Miglyol, Estern von Palmitinsäure (hauptsächlich Isopropylpalmitat), Pflanzenöle, Vaselineöl. Das Tensid AOT wird für mehrere in dieser Erfindung angegebene Beispiele verwendet. Auf jeden Fall kann das Verfahren auf andere Tenside erweitert werden, wie in den Beispielen und in den Ansprüchen dieser Erfindung gezeigt wird.

Wir haben überraschend feststellen können, dass mizellare Lösungen solcher Systeme bis jetzt in der Literatur nicht beschrieben wurden. Diese sind thermodynamisch stabil und können wertvolle Peptid- und Proteinanteile enthalten. Diese Erfindung beschäftigt sich hauptsächlich mit der Applikation der topischen Anwendung von EGF.

Als Ergänzung beschreibt man das Verfahren, bei welchem in solchen Systemen auch der tryptische Kunitzinh inhibitor (Aprotinin) oder Lipoxxygenaseinhibitoren oder nicht-steroidales Antiphlogistikum oder Natriumialuronat solubilisiert wird.

Die Gesamtheit der zwei mizellaren Systeme (eines enthält EGF, das andere den Inhibitor oder das nicht-steroidale Antiphlogistikum oder Natriumialurat) kann als stabile Mischung für therapeutische Zwecke verwendet werden.

Es ist schon bekannt, dass EGF eine Wirkung auf die Augen haben kann; siehe P.N. Patil, Trends in Bioch. Sc., 201, Mai 1984. Ausserdem ist es wohl bekannt, dass die gewöhnlichen Augenlösungen grosse Verluste vom Aktiv-

prinzip bewirken. Diese sind normalerweise wässrige Lösungen und werden leicht durch die Tränensekretion verdünnt und entfernt. Ein öliges Lösungsmittel wäre daher sehr geeignet, in dem es schwieriger ausgewaschen werden kann, aber es ist unmöglich, EGF (oder jedes andere Protein oder Peptid oder hydrophile Verbindung) in öliger Lösungen zu solubilisieren.

Die invertierte Mizellen (oft Mikroemulsionen Wasser-in-Öl benannt) sind nämlich ein Mittel, um diese Hindernis zu überwinden. Das EGF wird leicht in die wässrige Mikrophase aufgenommen und kann aus der organischen Phase diffundieren. Die vom Tensid verursachte Abnahme der Oberflächenspannung stellt einen guten Kontakt zu der zu pflegenden Oberfläche und eine gleichmässige Verteilung sicher. Mit Stoffen von relativ kleiner Viskosität, wie die obengenannten organischen Lösungsmittel, kann man Tropfen von winzigen Abmessungen bilden.

Dies ist bei der Herstellung von Augentropfen enorm wichtig, weil das Volumen der Augentropfen normalerweise 7 Mikroliter beträgt. Grössere Flüssigkeitsanteile werden sofort aus den Augen ausgestossen. Der grosse Vorteil dieses Systems besteht in der Tatsache, dass der teure biologische Stoff, in unserem Fall EGF, nicht verloren geht, wie im Falle von reinen wässrigen Augentropfen. Ein mit der Therapie vieler Verletzungen verknüpft Problem ist die Tatsache, dass die proteinasische Aktivität eine Verlangsamung der Genesung bewirkt. Es wurde indirekt bewiesen, dass Proteinaseinhibitoren diese Probleme erleichtern können, weil sie die Proteinasewirkung eliminieren. Wie oben gesagt, können die Inhibitoren leicht in die umgekehrte Mizellen aufgenommen werden. Das Inhibitoren enthaltende System wird

- 14 -

in der Therapie als Coadjuvant verwendet.

Man kann auf zwei Wegen die gemischten Systeme vorbereiten: EGF und Inhibitor (z.B. Aprotinin; siehe die Beispiele) werden zusammen zu einer wässrigen Lösung
5 zugegeben, und diese Mischung wird zum mizellaren Kohlenwasserstoffsystem hinzugefügt, wie weiter unten besser beschrieben. Es können auch zwei verschiedene mizellare Lösungen hergestellt werden, die später durchgemischt werden, oder sie können äusserlich nacheinander zugegeben
10 werden, wenn immer möglich in geeigneten und verschiedenen Dosen.

Es ist ausserdem bekannt - siehe: R. Rochels und W.D. Busse, Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophtalmol. 220, 74 (1983) - , dass einige Lipoxxygenaseinhibitoren
15 die neue Epitelbildung bei Kaninchen, deren Hornepitel ausgekratzt worden ist, beschleunigen. Natriumialuronat scheint einen ähnlichen Effekt zu haben. Auch in diesem Fall kann ein gemischtes System die therapeutische Wirkung des EGF günstigen.

Bei der Herstellung der mizellaren Lösungen, die EGF oder Aprotinin oder Cyclooxygenaseninhibitoren oder Natriumialuronat enthalten, wird dem klassischen Verfahren zur Herstellung enzymatischer mizellarer Lösungen gefolgt; siehe: R. Wolf und P.L. Luisi, Bioch.
20 Bioph. Res. Comm. 89, 209 (1979). Das Tensid (z.B. AOT) wird im Lösungsmittel gelöst, so dass eine Tensidlösung zwischen 50 mM und 300 mM entsteht. Die Auflösung tritt bei Raumtemperatur und ohne Sonifizierung auf.
25

Zu dieser Lösung kann man die wässrige EGF-Lösung
30 des Biopolymers zugeben, z.B. 1 ml einer gepufferten Lösung von Phosphat (50 mM pH 7,0) wird zu 100 ml der vorherigen organischen AOT-Lösung zugefügt. Der Anteil von Wasser im System kann auf jeden Fall zwischen 0 bis

- 15 -

30%, insbesondere zwischen 0,0% bis 10% (v:v) variieren.

Unter diesen Bedingungen entsteht beim Schütteln von Hand in einigen Minuten und ohne Sonifizierung eine klare und durchsichtige Lösung. Als Lösungsmittel kommen

5 - wie schon erwähnt - niedermolekulare Kohlenwasserstoffe, chlorierte Kohlenwasserstoffe, natürliche und pflanzliche Öle, Squalan, Squalen, Ester von Palmitinsäure und anderen Fettsäuren, Miglyol, natürliche Essenzen in Frage. Die schlussendliche Konzentration des Biopolymers (in unserem

10 Fall EGF oder ein Proteininhibitor) kann innerhalb der schlussendlichen Lösung in einem breiten Bereich variieren, gemäss der wässrigen Startlösung und dem Gebrauch. Normalerweise variiert sie zwischen 0,1 - 100 mg/ml, insbesondere 0,1 - 10 mg/ml (Konzentration bezüglich totalem

15 Volumen). Der pH-Wert kann auch breit variiert werden, aber normalerweise werden Lösungen mit einem pH-Wert zwischen 4 und 9 verwendet.

Die auf diese Weise vorbereiteten Lösungen sind für lange Zeit stabil, im besonderen, wenn sie im Kühlschrank (0 - 2° C) aufbewahrt werden. Für eine verlängerte Aufbewahrung werden die Lösungen unter 0° C abgekühlt. Ein Niederschlag wird nur bei höherer Wasserkonzentration (zwischen 5% - 10%) beobachtet, aber das System ist reversibel.

20

25 Es ist zu bemerken, dass bei niedriger Wasserkonzentration (unter 3%) das Wasser nicht bei 0° C gefriert.

Beispiel 1

0,44 g AOT werden in 10 ml Isopropylpalmitat

30 gelöst, so dass eine 100 mM Lösung des Tensides entsteht.

Zu dieser Lösung werden mittels einer Mikrospritze 100 Mikroliter einer wässrigen EGF-Lösung zugegeben (1 mg/ml in 50 mM Phosphat-Puffer bei einem pH-Wert

- 16 -

von 7). Die Zugabe wird langsam durchgeführt, und nach Beendigung der Zugabe wird langsam von Hand gerührt.

Am Schluss der Operation erhält man eine klare Lösung, deren Gehalt an EGF spektrophotometrisch bestimmt werden kann.

Beispiel 2

Eine Natriumlaurat (200 mM) Lösung in Squalan mit 10% Hexan-1-ol wird bei Raumtemperatur vorbereitet.
10 In 10 ml dieser Lösung werden langsam 300 Mikroliter einer wässrigen EGF-Lösung (1 mg/1 ml) eingespritzt. Man arbeitet wie oben beschrieben. Die endgültige Lösung enthält 3 % Wasser in 0,03 mg/ml EGF.

15 Beispiel 3

100 mg BRIT 56, welches 6% Hexan-1-ol und 1% Wasser enthält, bilden eine Mikroemulsion in Miglyol Shell. Zu 10 ml dieser Lösung werden langsam mit einer Mikrospritze 200 Mikroliter einer EGF-Lösung (1,5 mg/ml)
20 und 200 Mikroliter einer wässrigen Lösung von Aprotinin (Kunitz Inhibitor) zugefügt. Die Mischung wird langsam von Hand gerührt.

Anstatt Aprotinin kann man abwechselungsweise einen Lipoxxygenase- oder Natriumlaurat-Inhibitor verwenden, so dass das gleiche EGF:Coadivvante molare Verhältnis
25 erhalten bleibt.

Beispiel 4

Tetraethylenglykoldodecylether wird in Squalan
30 gelöst, so dass eine 200 mM Lösung des Tensides entsteht. Zu 100 ml dieser Lösung werden 3 ml einer wässrigen gepufferten Lösung (Borat 40 mM, pH 8,0), die den Kunitzinhibitor (Aprotinin) in einer Konzentration von 10 mg/ml enthält, hinzugefügt.

- 17 -

Schliesslich betrifft die Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung von Gelen aus Tensid-enthaltenden organischen Lösungsmitteln und deren Anwendung in der Biotechnologie, Pharmakologie, Photographie und
5 Kosmetik.

1. Dazu wird ein Verfahren beschrieben, um apolare Lösungen zu gelieren. Dies geschieht durch Lösungen von Tensiden in Kohlenwasserstoffen, welche auch Wasser und Gelatine enthalten. Bei den Bedingungen,
10 wo Gelatine in wässrigen Lösungen geliert, findet auch in den organischen Lösungsmitteln des Tensides eine Gelierung statt, wobei das gesamte organische Milieu in ein Gel umgewandelt wird.

2. Es ist bekannt, dass Gelatine in Wasser gelieren kann, und feste Gele bildet, die heutzutage eine grosse technologische Bedeutung, besonders in der Lebensmittelindustrie, haben. Diese Gele sind aber auch in anderen Bereichen der Technologie von Interesse, z.B. in der Photographie oder in all jenen Gebieten, in denen
20 hydrophile Filme oder Schichten wichtig sind. Bekanntlich wird die Gelierung in wässrigen Lösungen so durchgeführt, dass eine Lösung von Gelatine (z.B. 10 mg/ml) bei 40° oder höher hergestellt und dann abgekühlt wird.

- 18 -

Unterhalb 37° ca. findet die Gelierung statt. Dieses Phänomen wurde intensiv untersucht. Auch Verbindungen wie Polysaccharide können Gele bilden.

3. Andererseits ist auch bekannt, dass Proteine in apolaren Lösungsmitteln solubilisiert werden können, und zwar durch umgekehrte Mizellen oder Wasser/in Öl Mikroemulsionen. Umgekehrte Mizellen sind spheroidale Aggregate, die von gewissen Tensiden in Kohlenwasserstoffen und anderen organischen apolaren Lösungsmitteln gebildet werden, und zwar so, dass die polaren Köpfe der Tensidmoleküle nach innen gerichtet sind. Somit wird ein polarer Kern in der Mitte des spheroidalen Aggregates gebildet (eben die umgekehrte Mizelle), wobei die apolaren Ketten der Tensidmoleküle nach aussen in Kontakt mit dem apolaren Lösungsmittel stehen. Der polare Kern kann Wasser solubilisieren. Bei höherem Wassergehalt wird dann meist der Begriff "Mikroemulsion" anstatt "umgekehrte (oder invertierte) Mizelle" gebraucht. Im wässrigen Kern (dem sogenannten "water pool") können hydrophile Moleküle, inklusive Proteine, solubilisiert werden.

Mit diesen Methoden wurden in den letzten Jahren verschiedene Proteine, z.B. in Isooktan mit (2-Ethyl-hexyl)-Natriumsulfosukzinat (AOT) als Tensid solubilisiert, wobei der Wassergehalt im System nur 1-5% betrug. Man hat also ein System, bei welchen hydrophile Biopolymere in einem apolaren Lösungsmittel solubilisiert werden können. Eine solche Lösung ist thermodynamisch stabil und kann spektroskopisch analysiert werden. Es können damit normale enzymatische Reaktionen durchgeführt werden.

4. Der Hauptpunkt liegt nun darin, die zwei Verfahren, nämlich die Solubilisierung von Proteinen in apolaren Lösungsmitteln und die Gelierung, z.B. der Gelatine, zusammen zu kombinieren. Die Zubereitung

- 19 -

eines solchen apolaren Gels ist wie folgt zu beschreiben:
Gelatine wird in Wasser (oder gepufferte wässrige Lösun-
gen) gegeben und unter Rühren wird eine Lösung von
Gelatine in Wasser erhalten. Zur Gelatinelösung wird
5 ein organisches Lösungsmittel (z.B. Isooktan), welches
das Tensid enthält, zugegeben. Die Konzentration des
Tensids variiert zwischen 0 und 1 M, insbesondere zwi-
schen 5 und 300 mM. Der Volumenanteil des Wassers liegt
zwischen 0,5 und 30%. Der Gewichtsanteil von Gelatine
10 in der wässrigen Lösung beträgt 1 - 70%, insbesondere
5 - 50%. Die ganze Operation der Vorbereitung und
Mischung der beiden Lösungen erfolgt oberhalb des Gel-
schmelzpunktes, insbesondere zwischen 20 und 60° C. Beim
Abkühlen der resultierenden Mischung entsteht ein Gel.
15 Unter normalen Bedingungen wird der Uebergang bei der
gleichen Temperatur beobachtet, bei der die Gelbildung
auch in wässriger Lösung erfolgt. Der Vorgang der Gel-
bildung aus apolaren Lösungen mit umgekehrten Mizellen
oder Mikroemulsionen ist reversibel, d.h. das Gel kann
20 beim Erhitzen wieder geschmolzen werden. Unter gewissen
Bedingungen, Wassergehalt und Gelatinekonzentration, sind
die Gele durchsichtig. Die Gelierung der organischen
Phase findet nicht bei jeder beliebigen Kombination von
Wassergehalt und Gelatinekonzentration statt. Im allge-
25 meinen gilt, dass wenn der Wassergehalt verkleinert wird,
die Gelatinekonzentration dementsprechend erhöht werden
muss (siehe Abbildung 1).

5. Die Bildung des Gels findet auch in Anwesen-
heit von anderen Molekülen, zusätzlich zur Gelatine,
30 statt. Auf diese Weise können verschiedene Verbindungen
in der gelierten Masse homogen verteilt werden. Interes-
santerweise ist dies der Fall sowohl für hydrophile Mole-
küle, die im Wasserkern der umgekehrten Mizelle solubili-

- 20 -

siert sind, als auch für ganz hydrophobe Moleküle, die im organischen Lösungsmittel ausserhalb der wässrigen Mikrophasen solubilisiert sind. Dies kann auch mit amphiphilen Molekülen stattfinden, d.h. Molekülen, die in der Wand der Mizelle inkorporiert sind. Es ist somit ersichtlich, dass mit unserer Methode drei wichtige Klassen von Verbindungen, nämlich wasserlösliche, in apolaren Lösungsmitteln lösliche, und solche, die sich in Zwischenphasen aufhalten, homogen in ein Gel eingebettet werden können. Man kann so z.B. hydrophile Enzyme oder sogar Zellen in die Gelmasse einbetten. Dies kann von grossem biotechnologischen Interesse sein, weil dieses System eine Methode anbietet, mit welcher Enzyme und Zellen in ein hydrophobes Milieu eingebracht werden können. In die Gelmasse kann man ferner auch Pigmente und Farbstoffe (für die photographische Industrie von besonderer Bedeutung) oder auch Arzneimittel einbetten. Letzteres dürfte für eine kutane Behandlung interessant sein. Schliesslich kann die gelierte Masse auch in der Kosmetik Verwendung finden, wenn ein geeigneter Wirkstoff eingeschlossen wird.

6. Dieser Vorgang der Gelierung von apolaren Lösungsmitteln ist nicht auf das System Isooktan/AOT beschränkt. Andere aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe, sowohl synthetischer wie auch natürlicher Herkunft, können als Lösungsmittel dienen. Es können auch Lösungsmittelmischungen verwendet werden. Andere Tenside anionischer, kationischer und auch nicht ionischer Natur (wie diejenigen, die eine Aethylenoxydstruktur besitzen), können ebenfalls benutzt werden. Anstelle von Gelatine können andere Verbindungen verwendet werden, die in wässrigen Lösungen Gele bilden, z.B. Polysaccharide, wie Agarose, Agar-Agar und andere.

- 21 -

BEISPIELEBeispiel 1Herstellung von Gelen aus Kohlenwasserstoffen

- 5 220 mg Gelatine (250 Bloom, Fluka) werden unter
Rühren in 0,72 ml Wasser gelöst. Zu dieser Gelatinelö-
sung werden 2,5 ml 200 mM AOT/Isooktan-Lösung zugefügt
und die Mischung anschliessend mit Isooktan auf total 5
ml verdünnt. Alle diese Operationen werden oberhalb
10 40° C durchgeführt. Die Lösung wird dann unter Rühren
auf Raumtemperatur abgekühlt. Es entsteht ein festes Gel.

Beispiel 2Einschluss eines wasserlöslichen Farbstoffes

- 15 Wie in Beispiel 1, ausser dass anstelle von
Wasser eine wässrige 1 mM Alizarinrot S Lösung verwendet
wird. Es entsteht ein rotes Gel.

Beispiel 3

20 Einschluss eines Isooktan-löslichen Farbstoffes

Wie in Beispiel 1, ausser dass die 2,5 ml
200 mM AOT/Isooktan-Lösung noch 1 mg Sudanrot 7B ent-
hält. Es entsteht ein tiefrotes Gel.

25 Beispiel 4

Einschluss eines Wirkstoffes

Wie in Beispiel 1, ausser dass anstelle von
Wasser eine wässrige 0,5 mM Vitamin B₁₂ Lösung verwendet
wird. Es entsteht ein rosarotes Gel.

- 22 -

Beispiel 5Einschluss eines Aromastoffes

Wie in Beispiel 1, ausser dass anstelle von Wasser eine wässrige 3 mM Lösung von Vanillin verwendet wird. Es entsteht ein farbloses transparentes Gel:

Beispiel 6Einschluss eines Enzyms

Wie in Beispiel 1, ausser dass anstelle von Wasser eine wässrige 10^{-5} M Lipxygenase Lösung verwendet wird.

- 23 -

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Herstellung von Lösungen von umgekehrten Mizellen (auch Mikroemulsionen genannt, wenn der Gehalt an Wasser im System relativ gross ist) mittels Tensid AOT, Natrium-1,2-bis(2-Ethylhexyloxycarbonyl)-1-ethansulfonat, und natürlichen organischen Lösungsmitteln, wie Squalan, essentielle Öle, Terpene, Pflanzenöle, Miglyol, Estern von natürlichen Fettsäuren (Palmitinsäure, Stearinsäure usw.), perfluorierte Kohlenwasserstoffe.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass andere Tenside anstelle von AOT verwendet werden, insbesondere Benzalconiumchlorid; CTAB (Cethyltrimethyl-ammoniumbromid); Tenside auf der Grundlage von anderen quaternären Ammoniumsalzen; Tenside auf der Grundlage von Ethylenglykol; Tenside natürlicher Herkunft wie Phospholipide, Lecithine, Phospholecithine, Phosphodilcoline; synthetische Tenside, die als Grundkern Glycerin haben; Tenside, die die Struktur von Estern von Fettsäuren, wie z.B. Sorbitantristearat oder Polyoxyethylensorbitan Oleat (Polisorbato 80), aufweisen.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass Co-Oberflächenmittel oder Coadjuvanten zum System zugegeben werden (sowie jede Mischung von zwei oder mehreren von den obengenannten Tensiden).
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das System Stoffe enthält, die eine therapeutische oder kosmetische Aktivität aufweisen.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

- 24 -

dadurch gekennzeichnet, dass das System Arzneimittel enthält und gebraucht wird, um die Absorption im Darm sowie durch die Haut zu begünstigen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
5 dadurch gekennzeichnet, dass das System Stoffe enthält, die eine kosmetische Wirkung aufweisen und das Eindringen in die Haut begünstigen (z.B. Enzyme als Coadjuvanten für Enthaarung).

7. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung
10 von Lösungen umgekehrter Mizellen (auch Mikroemulsionen genannt, wenn der Wassergehalt im System relativ gross ist), mittels Tensid AOT, Natrium-1,2-bis(2-Ethylhexyoxycarbonyl)-1-ethansulfonat und natürlichen organischen Lösungsmitteln, wie Squalan, essentielle Öle, Pflanzenöle, Miglyol, Estern von natürlichen Fettsäuren
15 (Palmitinsäure, Stearinsäure usw.).

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das System Verbindungen enthält, die die neue Epitelbildung anregen können.

- 20 9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das System den epidermischen Wachstumsfaktor (EGF) oder andere natürliche oder synthetische Wachstumsfaktoren für therapeutische oder klinische Anwendungen enthält.

- 25 10. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das System Proteaseninhibitoren oder Lipxygenase oder nicht steroidale Antiphlogistika oder Natriumhialuronat enthält.

- 30 11. Verfahren, in dem die Zusammenstellung der Ansprüche 9 und 10 für die klinische Anwendung verwendet wird und insbesondere für die neue Horn-Epitelbildung (Hormonauskraatzung, Geschwüre, "Cheratitis") und für die Verbrennungsbehandlung.

- 25 -

12. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass andere Tenside anstatt AOT verwendet werden, insbesondere Benzalconiumchlorid; CTAB (Cethyl-trimethyl-ammoniumbromid); Tenside auf der Grundlage von anderen quaternären Ammoniumsalzen; Tenside auf der Grundlage von Ethylenglykol; Tenside natürlicher Herkunft, wie Phospholipide, Lecithine, Phosphodilcoline; synthetische Tenside, die als Grundkern Glycerin haben; Tenside, die die Struktur von Estern von Fettsäuren haben, z.B. Sorbitantristerat oder Polyoxyethylensorbitan (Poly-sorbat 80).

13. Verfahren nach den Ansprüchen 7 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass Co-Oberflächenmittel oder Coadjuvanten zum System zugegeben werden (sowie jede Mischung von zwei oder mehreren von den obengenannten Tensiden).

14. Verfahren zur Herstellung von Gelen, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Gemisch von Isooktan, AOT, Wasser und Gelatine herstellt und gelieren lässt.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass andere apolare Lösungsmittel wie z.B. Perfluorverbindungen und natürliche Öle und Flüssigkeiten verwendet werden.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass anstelle von AOT auch andere Tenside oder Tensidsysteme verwendet werden.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass Agarose oder andere Polysaccharide anstelle von Gelatine verwendet werden.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere zusätzliche Verbindungen in der Mischung vorhanden sind und bei der Gelierung im Gel festgehalten werden, wobei

- 26 -

solche zusätzlichen Verbindungen sowohl hochmolekulare Produkte sein können, wie Proteine, Enzyme, Nukleinsäuren, Zellen, Viren und Mikroorganismen, als auch niedermolekulare Verbindungen wie Pigmente, Farbstoffe, Pharmaka und auch Salze.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass solche Gele in der Pharmakologie verwendet werden, und zwar zu dermalen Applikationen und Behandlungen.

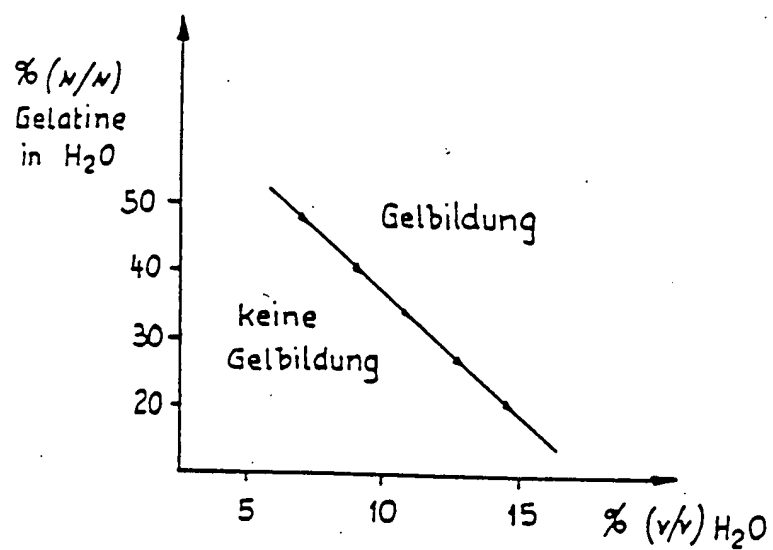
10 20. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass solche Gele als Pigment- oder Farbstoffträger verwendet werden, z.B. in der Photographie.

21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass solche Gele für Chromatographie und/oder
15 Elektrophorese verwendet werden.

22. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass solche Gele als Träger von Enzymen, Mikroorganismen und Zellen verwendet werden.

1/1

Fig. 1



This Page Blank (uspto)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Patenzichen PCT/CH 86/00154

I. KLASSEFIZKATION DES ANMELDUNGS-GE-GENSTANDS (der mehreren Klassifikations-sym-bolen sind eine anzugeben)
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der PC

A 61 K 7/00; A 61 K 9/10

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Klassifikationssystem: A 61 K
Recherchierte Mindeststoff: Klassifikationssymbole

Recherchierte nicht zum Mindeststoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN

Anz.: Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹² Betr. Anspruch Nr. 13

A FR, M, 4690 (MERCK & CO.) 30. Januar 1967, siehe Seite 2, rechte Spalte, Zusammenfassung

A US, A, 3492399 (PRIGAL) 27. Januar 1970, siehe Spalte 1, Zeile 1 - Spalte 2, Zeile 49; Spalte 10, Zeile 73 - Spalte 11, Zeile 25

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung bewegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Sostere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Januar 1986

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19 FEB. 1986

Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt

Unterschrift des Bevollmächtigten Sachsteten

M. VAN NIEUW

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE

INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR. PCT/CH 85/00154 (SA 10923)

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben. Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 11/02/86

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR-M- 4690		GB-A- 974625	
		CH-A- 413237	
		FR-A- 1353460	
		NL-A- 269002	
US-A- 3492399	27/01/70	Keine	

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang :
siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/CH 85/00154

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁴ A 61 K 7/00; A 61 K 9/10											
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: right; font-size: small;">Minimum Documentation Searched †</div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%; border-bottom: 1px solid black; font-size: small;">Classification System </td> <td style="border-bottom: 1px solid black; font-size: small;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Int.Cl.⁴</td> <td style="border: none;">A 61 K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: x-small; margin-top: 10px;"> Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched * </div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. ⁴	A 61 K					
Classification System	Classification Symbols										
Int.Cl. ⁴	A 61 K										
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ‡ <table style="width: 100%; border: none; font-size: x-small;"> <tr> <th style="width: 5%; text-align: left;">Category * </th> <th style="width: 75%; text-align: left;">Citation of Document, † with indication, where appropriate, of the relevant passages ††</th> <th style="width: 20%; text-align: left;">Relevant to Claim No. ††</th> </tr> <tr> <td style="border: none; vertical-align: top;">A</td> <td style="border: none;">FR. M. 4690 (MERCK & CO.) 30 January 1967, see page 2, right hand column, abstract</td> <td style="border: none;"></td> </tr> <tr> <td style="border: none; vertical-align: top;">A</td> <td style="border: none;">US. A. 3492399 (PRIGAL) 27 January 1970, see column 1, line 1 - column 2, line 49; column 10, line 73 - column 11, line 25 -----</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>			Category *	Citation of Document, † with indication, where appropriate, of the relevant passages ††	Relevant to Claim No. ††	A	FR. M. 4690 (MERCK & CO.) 30 January 1967, see page 2, right hand column, abstract		A	US. A. 3492399 (PRIGAL) 27 January 1970, see column 1, line 1 - column 2, line 49; column 10, line 73 - column 11, line 25 -----	
Category *	Citation of Document, † with indication, where appropriate, of the relevant passages ††	Relevant to Claim No. ††									
A	FR. M. 4690 (MERCK & CO.) 30 January 1967, see page 2, right hand column, abstract										
A	US. A. 3492399 (PRIGAL) 27 January 1970, see column 1, line 1 - column 2, line 49; column 10, line 73 - column 11, line 25 -----										
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> * Special categories of cited documents: †§ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </div> <div style="width: 48%;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Δ" document member of the same patent family </div> </div>											
IV. CERTIFICATION											
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center;">27 January 1986 (27.01.86)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center;">19 February 1986 (19.02.86)</div>										
International Searching Authority <div style="text-align: center;">European Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer										

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/CH 85/00154 (SA 10923)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 11/02/86

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-M- 4690		GB-A- 974625 CH-A- 413237 FR-A- 1353460 NL-A- 269002	
US-A- 3492399	27/01/70	None	

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

21